

Polymer blends containing polymer of beta -hydroxybutyric acid and chlorine or nitrile group containing polymer

Patent Number: US4393167

Publication date: 1983-07-12

Inventor(s): HOLMES PAUL A [GB]; WILLMOUTH FRANK M [GB]; NEWTON ALAN B [GB]

Applicant(s): ICI PLC [GB]

Requested Patent: JP57150393

Application Number: US19810320127 19811110

Priority Number (s): GB19800036967 19801118

IPC Classification: C08L27/06; C08L33/18; C08L67/04

EC Classification: C08G63/06, C08L67/04, C12P7/62A

Equivalents: DE3168826D, EP0052460, B1, JP1782389C, JP1782493C, JP1888568C,
 JP3149255, JP4069186B, JP4070342B, JP57111349, JP6015604B

Abstract

Polymer blends containing (i) 0.2-95% by weight of a high molecular weight beta -hydroxybutyric acid homo- or copolymer and (ii) a polymer containing at least 25% by weight of chlorine or nitrile groups, such as chlorinated polyethylene, polyvinyl chloride, or a high acrylonitrile resin. In small quantities the beta -hydroxybutyric acid polymer acts as a processing aid for the chlorine or nitrile containing polymer. In larger quantities the properties of the beta -hydroxybutyric acid polymer or the chlorine or nitrile containing polymer are improved.

Data supplied from the esp@cenet database - i2

⑨ 日本国特許庁 (JP) ⑩ 特許出願公開

公開特許公報(A) 1982年1月21日 昭57-150393

④Int. Cl.³ 識別記号 庁内整理番号 ④公開 昭和57年(1982)9月17日
C 12 P 7/42 6760-4B 発明の數 2
C 08 G 63/06 7919-4 I 審査請求書 未請求

(全 18 页)

④ β -ヒドロキシブチレート重合体およびその 製造法

イギリス国クリーブランド・ヌ
トツクトンーオンーティーズ・
ノートン・ザ・グリーン・ノー
トン・ホール(番地なし)

◎特 題：昭56-185153

②出願 昭56(1981)11月18日
優先権主張 ②1980年11月18日 ②イギリス

④出頭人：インペリアル・ケミカル・インダストリーズ・ペールシード・イギリス国ロンドン市エスダブリュード・ジエイ・エフ・ミルバンク・インペリアル・ケミカル・ハウス(略地なし)

②發明者 ポール・アーサー・ホルムズ
イギリス國クリーブランド・ス
トツクトン・オン・ティーズ・
ノートン・ザ・グリーン・ノー
トン・ホール(番地なし)

④代 理 人 弁理士 湯浅恭三 外2名
最終頁に續く

19. *Leucosia* *leucostoma* *leucostoma* *leucostoma* *leucostoma* *leucostoma* *leucostoma*

の炭素原子を含む基である特に請求の範囲第1項
または第2項記載の基を含む。

第10発明の名称 β-ヒドロキシブチレート重合体およびその 製造法

水素原子である特許請求の範囲第1項ないし第3項に記載する装置の全體

2 [特許請求の範囲] (1) 重量平均分子量 1,000 以上を有し、次の繰返し単位 I を 9.9.9 ないし 5.0 モル %

(5) R^1 、 R^2 および R^4 がそれぞれ水素原子である。

—OCR¹R²(CR³R⁴)_nCO— II
 (式中 n は 0 または 1、R¹、R²、R³ および R⁴
 はそれぞれ炭化水素基；ヘロ⁵またはヒドロキシ
 -置換炭化水素基；ヒドロキシ基；ハロゲン原子
 および水素原子から選択するが、n が 1 のときは
 R²、R³ および R⁴ はそれぞれ水素原子で、R¹
 はメチル基ではない) は、
 を含む共重合体。 -
 (2) n が 1 である特許請求の範囲第 1 項記載の共
 重合体。
 (3) R¹、R²、R³ および R⁴ はそれぞれ 4 個以下

(6) R' がエチル基である特許請求の範囲第1項

(7) 重量平均分子量 200000 以上を有する導

の共重合体。

(4) 諸基準を1ないし4のモード含む特許請求の範囲第1項ないし第7項の何れかに記載の共通合体。

(3) ポリエステルを蓄積できる微生物を、水溶性同化性炭素含有基質の水性培地で、培養の少なくとも一部は微生物蓄積の必須要件の一つまたはそれ以上を制限するがポリエステル蓄積を制限しない条件下で培養する熱可塑性ポリエステルの製造

法において、培養を制限した期間の少なくとも一部の間で、基質がこの制限された条件下で微生物により誘導し単位-OCH(CH₃)CH₂CO-のみよりなる以外のポリエステルに代謝できる有機酸またはその塩よりなることを特徴とする方法。

(10) 硫をプロピオン酸、脂肪酸およびアクリル酸より選択する特許請求の範囲第8項記載の方法。

(11) 微生物繁殖の必要条件の一つまたはそれ以上を制限するが、ポリエステル基を制限しない条件下で、微生物の増殖を行う期間の少なくとも一部のとき、硫を唯一の基質とする特許請求の範囲第9項または第10項記載の方法。

(12) 硫が微生物培養の全期間を通じての唯一の基質である特許請求の範囲第11項記載の方法。

(13) 基質として炭化水素を用いて微生物を繁殖させる特許請求の範囲第9項ないし第11項の何れかに記載の方法。

(14) 炭化水素がグルコースである特許請求の範囲第13項記載の方法。

(15) 培養が微生物繁殖の必要条件の一つまたはそ

れ以上を制限するが、ポリエステル基を制限しない条件下である期間の少なくとも一部での基質が、酸および炭化水素の混合物である特許請求の範囲第13項または第14項記載の方法。

(16) 制限する基質の必要条件であるが、ポリエステル基には必要条件でないのは、盐基源である特許請求の範囲第9項ないし第11項の何れかに記載の方法。

1.【発明の詳細を説明】

この発明は、ポリマー-ヒドロキシ脂肪酸(以下P HBと略記する)に関するものである。

P HBは、微生物細胞内蔵で分子状のエカルバ-1-ヒドロキシ酸として、種々の微生物、主としてバクテリアにより蓄積される。

このような細胞から抽出したP HBは、次の構造単位の熱可塑性ポリエステルであり、



急速に比較的高いレベルまで結晶化し、例えば7.0またはそれ以上のオーダーである。この結晶化熱は、高分子を例えば成形用材料として使

用するときには、しばしば欠点となる。

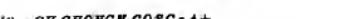
この発明により、P HBの結晶化は、高分子量に非線形单量体単位を組み入れることで達成できることが判明した。

下記の高分子合成を導く代謝経路の説明では、次の略号を用いた：

C₆AS₂は、末エカルバ-1-ヒドロキシ酸である。したがってCH₃COSCO₂Aは、ヒドロキシ酸のアセチルチオエスカルバ-1-ヒドロキシ酸である。NADPは、酸化状態のニコチン酸アミドアデニジクレオナドである。NADPH₂は、還元したNADPである。

微生物によるP HBの合成における第1工程は、アセチルCoAの合成と考えられる。これは、例えば細胞CoAと脂肪酸エカルバ-1-ヒドロキシ酸との結合(炭化水素のグリコリシス(解糖)生成物またはオキサロアセテート(トリカルボン酸(TCA)サイクルまたはグレブサイクル)の一員である)の脱カルボキシ化で生成する]の脱カルボキシ化により形成される。

したがつて、アセチルCoA源としての脂肪酸で、P HBは次の反応を含む代謝経路で製造される：



ここで(-OCH(CH₃)CH₂CO-)_{n-1}は(n-1)個の誘導し単位を含むP HBである。したがつて、反応(4)は、-OCH(CH₃)CH₂CO-単位を高分子量に附加する。

この発明により、ある種の有機酸の存在下に、一定条件下で微生物を培養することにより、高分子量に少部分の共単量体単位を導入できることが

判明した。プラスチック材料として実用的用途のためには、重量平均分子量(Mw)1,000,000以上(例えばゲル透過クロマトグラフィで測定)でなければならない。

したがつて、この発明により重量平均分子量1,000,000以上で縮合し单位

(1) $-OCH(CH_3)CH_2CO-$

9.9ないし5.0モルカ比で縮合し单位

(2) $-OCR^1R^2(CR^3R^4)CO-$

0.1ないし5.0モルカ比有する共重合体を提供する。

(式中 α は0または1、 R^1 、 R^2 、 R^3 および R^4 はそれぞれ炭化水素基、例えばアルキル基、アラルキル基、アリール基またはアルカリール基、ヘロ-キおよびヒドロキ-基換炭化水素基、ヒドロキ基、ヘロゲン原子および水素原子から選択する、ただし $\alpha=1$ 、 R^1 、 R^2 および R^4 がそれぞれ水素原子のとき、 R^1 はメチル基ではない)。

基 R^1 、 R^2 、 R^3 および R^4 は、それぞれ個以下の炭素原子を含むものが好ましい。一般に、基

R^1 、 R^2 、 R^3 および R^4 の少なくとも1個は、水素原子である。

用いる各单体はある程度の非特異性を有しているので、このよう共重合体が製造できる。

反応(1)に與する单体オキナーゼは、広範な特異性を有し、オキナーゼは次の反応により、

複数 α を複数の他のカルボキシ基に結合させる:

(1a) $RCOO^- + C_6H_5CO + RCOOC_6H_5 + A + OH^-$

例: $CH_3CH_2COO^- + C_6H_5CO + CH_3CH_2COOC_6H_5 + A + OH^-$

(プロピオニルC₆H₅CO)

单体 α -ケトオキナーゼが與する反応は、次のように示される:

(2) $CH_3COSC_6H_5 + A + CH_3COSC_6H_5 + C_6H_5ASH$

この反応は一部特異的で、一方の反応体はアセナル C_6H_5A でなければならない。したがつて、一般的な反応は、次の通りである:

(2a) $R-COSC_6H_5 + A + CH_3COSC_6H_5 + C_6H_5ASH$

同様に、反応(2)のレダクターゼ单体の特異性は、

次のようにして一般式 $RCOCH_2COSC_6H_5 + A$ の脂防族アシルオキシカルボン酸を還元する:

(3a) $R-COCH_2COSC_6H_5 + A + NADPH_2 \rightarrow$

$RCH_2CH_2COSC_6H_5 + A + NADP$

反応(4)のポリメラーゼ单体は、絶対特異性ではない。一般的の反応は、次のように示される:

(4a) $RCOOCH_2CH_2COSC_6H_5 + A + \alpha OCH_2CH_2COO^- \rightarrow$

$(-OCH_2CH_2COO^-)_n - OCH_2CH_2COO^- + C_6H_5ASH$

(R と R' とは異つてもよい)

したがつて、このルートは、次の単位を含む重合体になる:

$-OCH_2CH_2COO^-$

即ち単位 $-OCH_2CH_2COO^-$

(R 、 R' 、 R^2 および R^4 はそれぞれ水素原子)

もし、若干の縮合し単位中、 R^1 がメチルでなければ、共重合体が得られる。

反応(4a)の反応体である α -ヒドロキシオキカルボン酸、例えば $RCOOCH_2CH_2COSC_6H_5A$ は、場合により、非特異性脂防族二重結合单体 $RCOCH_2CH_2COO^-$ 、 $R^1=H$ 。したがつて、もし R^1 および R^4 がそれぞれ水素原子でなく、縮合し単位 R^1 の若干がメチル基でなければ、共重合体が得られる。

る:

(5a) $R^1R^2O=CR^3COO^- + H_2O \xrightarrow{\text{ニノイヒドロゲン}} R^1R^2C(CH_2)CHR^3COO^-$

(5b) $R^1R^2C(OH)CHR^3COO^- + C_6H_5ASH \rightarrow R^1R^2C(OH)CHR^3COSC_6H_5 + A + OH^-$

〔反応(5a)、(5b)は、逆にすることもできる。即ち炭素-炭素二重結合の水素化は、オキエステル化反応の後に起きててもよい〕。 R^1 、 R^2 および R^3 は、必ずしも水素原子でなくてもよい。

したがつて、反応(5a)、(5b)および(4a)

を用いて、次の単位を重合体鎖に導入すること

もできる:

$-OCR^1R^2CHR^3CO-$

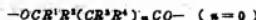
即ち、単位 $-OCR^1R^2CHR^3R^4O-$ ($R^4=H$)。したがつて、もし R^1 および R^2 がそれぞれ水素原子でなく、縮合し単位 R^1 の若干がメチル基でなければ、共重合体が得られる。

反応(4a)のポリメラーゼ单体も非特異性であつて、 α -位置にヒドロキシ基を有する反応体、

例えば次のタイプのもの



即ち単位



を直合体様に導入する。

場合によつては、このポリメラーゼ酵素は、次の二式の β -ヒドロキシ反応体も変化する：



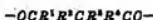
これらの反応体は、反応(1a)により対応する β -ヒドロキシ酵から作られる：



例えは、 β -ヒドロキシ酵酸は β -ヒドロキシブチリルCoAを与え、ビバリン酸はビバリルCoAを与える：



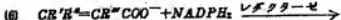
このよき反応体は、次の二式の単位



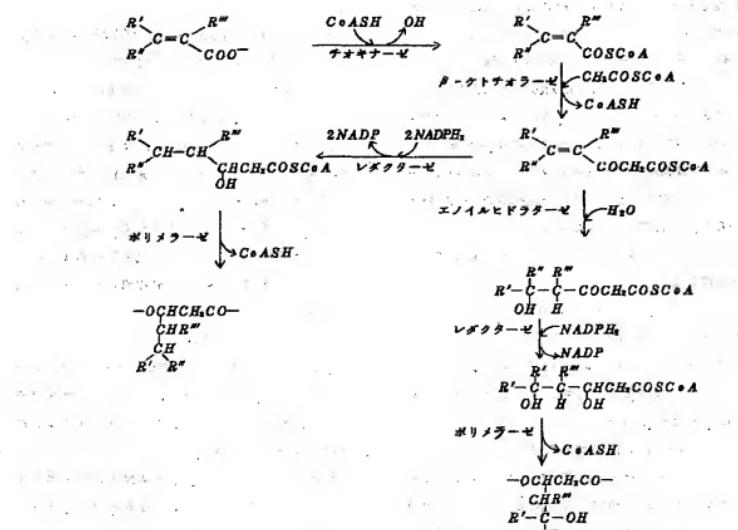
を直合体様に導入し、 R^1 、 R^2 および R^4 がそれぞれ水素原子で、換返し単位 R^3 の若干がメチル基

でなければ、直合体が得られる。

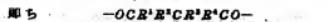
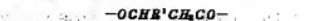
不飽和酸では、反応(5a)の代りに反応(5b)が起き、直合体合成は反応(2a)および(3a)を含むルートの外に、例えは反応(5a)による炭素-炭素二重結合の水素化または炭素-炭素二重結合の還元により進行し、例えは次の反応による：



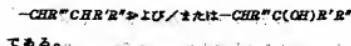
したがつて、一つの可能な経路は、次の通りである：



したがつて、これらのルートは、次の単位を含む共重合体をえる：



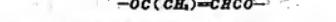
この場合 R' および R'' は、それぞれ水素原子で、 R' は



共重合体中の構成単位 II の割合は、共重合体の全構成単位の 0.1 ないし 8.0 モル%、特に 1 ないし 4.0 モル%である。場合によつては、微生物により得られる重合体は、構成単位 I の水素重合体と構成単位 I および II を含む共重合体との混合物である。この場合、重合体中の構成単位 II の全體の割合は、全構成単位の 0.1 ないし 8.0 モル%である。好ましくは、構成単位 II の割合は、1 ないし 3.0 モル%である。

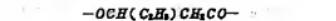
この発明により、上記の反応のコースに従う代りに、微生物は、上記の反応に加えてまたはその若干の代りに異様反応を行い、 β -位置のヒドロ

いる。Davis K によれば、 α -ヒドロキシ酸単位および次の β -ヒドロキシ- α -ブテン酸単位



を含む共重合体であるとされているこれら重合体は、*Neisseria* をループタンに培養して調達できる。

Wallen 外は *Environmental Sciences and Technology* 6 (1972) p. 1 611 ～ 1 64 および 8 (1974) p. 5 776 ～ 5 781 C、活性污泥から単離し反復洗浄後融点 97 ～ 1 00 °C で、 α -ヒドロキシ酸単位および次の β -ヒドロキシビペラリン酸単位



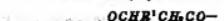
を 1 : 5 の比で含む重合体を発見している。

Marchessault 外は、*IUPAC Macromolecules Preprints 1980: International Symposium on Macromolecules Preprints* 2 (1980) p. 272 ～ 275 C、この化合物の研究を報告し、主として α -ヒドロキシビペラリン酸単位を含むことを確認している。

セタ基を介して重合体鎖に結合した α -ヒドロキシビペラリン酸単位および/または次の 3, 5-ジヒドロセタノン酸単位



を含む重合体をえる。したがつて、共重合体は、次の単位を含んでいる：



(式中 R' は、エチル基または β -ヒドロキシエチル基)。

$\alpha = 1$ 、 R' がエチル基、 R'' および R''' がそれぞれ水素原子の共重合体が好ましい。

α -ヒドロキシ酸単位および次単位



および他の単位を含むある種の重合体は、既に文献に記載されている。

テクノロジ不純物を示す赤外ペンドを示す重合体が、Davis K と Applied Microbiology 12 (1954) p. 801 ～ 804 に発表されている。

U.S.P. 3 278 610 には、ある種の微生物、特に *Neisseria salmonicola* を炭素数 4 個を含むカルボン酸に培養するポリエステルの微生物学的製造法が示されている。実施例 2 および 8 では、それぞれ α -ブテン酸および β -ヒドロキシ酸を用い、重合体は示された融点の 178 ～ 184 °C のオーダーからポリ α -ヒドロキシ脂肪酸である。しかし、実施例 1 では、2-メチルアクリル酸 (メタクリル酸) を用い、得られる重合体は融点定してないが、融点 215 ～ 220 °C を有し、かつメチルエチルケトンに可溶性と説明されている。これに対し、この発明の主とし α -ヒドロキシビペラリン酸を含む共重合体は、融点 180 °C 以下で 2-メチルエチルケトンに不溶性である。

P.H.B. 菌類性微生物を、適当な基質、即ちエニルギーおよび炭素源に好気的に培養すると、微生物は増殖のための必須要件の一つまたはそれ以上が消費されるまで増殖する。以下においてこの微生物の増殖を、“繁殖”と称する。繁殖必須要件の一つが消費されたとき、その後の繁殖は、もし

あつたとしても蓄積された程度であるが、基質は消費され、*PHB*は微生物に蓄積される。

ある種の微生物では、*PHB*前駆抑制因子、例えば1つまたはそれ以上の蓄積必須要件の前駆が存在しなくとも、微生物の蓄積中に*PHB*は蓄積するであろう；しかし、このように蓄積した*PHB*の量は一般に少量で、代謝的には得られる細胞の約1.0 wt%以下である。したがつて、バクテ式培養で蓄積したとき、1つまたはそれ以上の蓄積必須要件が消費されるまでは、殆んど*PHB*蓄積なしで微生物は繁殖し、その後微生物は*PHB*を合成する。

この発明により、共重合体を製造するために、蓄積のための必須要件の1つまたはそれ以上の量を制限するが、*PHB*蓄積は制限しない条件下での微生物の培養中、基質の少なくとも一部として一般に共重合体単位になる酸を用いる必要があることが判明した。蓄積の必須要件の制限を行わないときは、一般に酸は微生物により別の経路で代謝され、例えばアセチル-CoAまたは*TCA*サイク

たような量である。

基質および酸素（これは一般に細胞器の水性培地に空気を注入して供給される）に加えて、各種の栄養塩類が微生物が蓄積できるために必要である。したがつて、一般に同化できる形態の次の元素源（普通は水溶性塩）が必要である：塩素、リン、イオウ、カリ、ナトリウム、マグネシウム、カルシウムおよび鉄とともに微量元素、例えばマンガン、亜鉛および銅。酸素の細胞器への供給を制限してポリエチル蓄積を誘導することも可能であるが、1種またはそれ以上の栄養塩の量を制限するのが好ましい。制限するのに最も実用的な元素は、塩素、リンであり、好ましくないのはマグネシウム、イオウまたはカリである。これらの中でも、塩素（これはアンモニウム塩で供給するのが便利である）の量を制限するのが最も好ましい。必要とする同化性塩素の量は、ポリエチル蓄積の少ない細胞の所要量の約8～15%である。

細胞は、水性培地1g当たりポリエチル含有量

ルの一員になり、共重合体は製造されなくなる。したがつて、一例として、何らの蓄積制限をしてはプロピオン酸は微生物により代謝され、プロピオニル-CoAを経て炭酸ガスを取り込みメチルアコニル-CoA、次いで*TCA*サイクルの一員であるガクシキートになる。

したがつて、この発明により、ポリエチルを蓄積できる微生物を、水溶性、同化性塩素含有基質の水性培地で、培養の少なくとも一部は微生物蓄積の1つまたはそれ以上の必須要件を制限するがポリエチル蓄積は制限しない条件下で培養を実施して、熱可塑性ポリエチルを製造する方法において、培養を制限した期間が少なくとも一部の間で、基質がこの制限された条件下で微生物により、 $-OCH(CH_3)CH_2CO-$ 基団を単位のみよりなる以外のポリエチルに代謝できる有機酸またはその塩よりなることを代替とする方法を提供する。

この点に従し、前記のUS-P-8,275,610では得られる細胞の量は、蓄積制限が行われなかつ

るの細胞量が少なくとも5%になるように行なうのが好ましい。したがつて、もし例えは*PHB*含有量4.0 wt%の*PHB*含有細胞を1.0 g/m²で作らうとすれば、細胞蓄積量制限に用いるのに最適に供給する必須栄養の量は、*PHB*を含まない細胞8 g/m²の蓄積を支持するのに要する量である；したがつて、もし塩素を蓄積制限基質として用いれば、*PHB*を含まない細胞の塩素含有量は約8～15 wt%であるから、必要な同化性塩素の量は約0.5～0.9 g/m²である。例えばアンモニアイオン0.6～1.2 g/m²である。

酸素は、例えば H_2 、温度および通風の程度、（酸素を制限基質としないとき）を微生物に対し常用する条件下で行なう。同様に、用いる栄養塩類（その使用量は上記の条件を考慮して決定した、蓄積制限基質以外）は、微生物の蓄積に通常用いる量である。

微生物は、容易に代謝できる基質、例えば炭水化物に対し、重合体蓄積段階で制限すべき蓄積用に必要な充分の栄養源の存在下に、培養により所

量の重量まで繁殖させるのが好ましい。場合により、繁殖段階の少なくとも一部、また場合によつては全部に対する基質は、直合体蓄積段階で攝取し単位量になる段である。

酵母は、繁殖には必要であるが直合体蓄積には必要でない栄養源の量が消耗したときに、直合体蓄積が起こるバッテ式酵母で行われる。別法として、酵母は、新鮮な水性培地および基質の添加速度に対応する速度で、嫌気容器からバクテリア細胞を含む水性培地を連続的または間欠的に除去する連続式酵母で行う。嫌気容器に供給する制限した栄養源の量は、容器から除去した水性培地がこの栄養源を殆ど含まねような量で、容器から除去した水性培地を、次いでバッテ式または好ましくは連続式で採取する第2種酵母に供給し、共直合体生産性段を含む新鮮な基質の添加で、通気培養を維持して直合体蓄積を起こさせる。この追加酵母工程で、追加量の基質および栄養源を添加するが、追加量は一概に好ましくないので、制限条件に用いる栄養源は加えるべきではない。

のみを与える基質が、唯一の基質である。

場合によつては、この経路に必要な酵素をプロテグすることおよび/または必要な酵素合成の能力のない微生物を用いることにより、膜のアセチルCoAへの通常の代謝を阻止することも可能である。しかし、実質的収量の直合体を得るために、酵母に授する栄養を制限し、好ましくは消耗した条件下での一定期間の培養が、一概に好ましい。

酵母は、繁殖したポリエチルの量が、バクテリア細胞の約50~80%になるよう行うのが好ましい。

共直合体を得るのに用いられる膜は、培養が繁殖前段階であるとき、攝取し単位Iのみにならないものである。したがつて、不適当な膜には酵母および2-ヒドロキシ脂酸、TCAサイクルのメンバー、および培養が繁殖前段階になるとアセチルCoAのみを与える膜および/またはTCAサイクルのメンバーである。したがつて、不適当な膜には、ホスホグリセリン膜、ビルビン膜、タエン膜、イソクエン膜、 α -ケトグルタル膜、コ

しかし、第1嫌気容器から別の1個またはそれ以上の嫌気容器に供給した水性培地に、制限栄養源が若干の残存量を含むことおよび/またはその少量を追加することが、効率的な操作に好ましい。

上記のバッテ式または連続式の例の場合も、共直合体攝取し単位量を与えるのに用いられる膜は、繁殖に必要な栄養が消耗したときに起きた、直合体蓄積段階中の基質の一部または全量として用いる。この膜は、反覆単位Iを与える基質、例えば炭水化合物との混合物で用いるか、または唯一の基質が用いられる；後者の場合、十分な膜が、アセチルCoAへの別の経路で代謝されて攝取し単位Iを与え、もし別の経路が反応(2a)を含めば、攝取し単位量を得るために必要な量のアセチルCoAが用いられる。しかし、膜が唯一の基質であれば、直合体収量は往々にして低下する。

攝取し単位量を与える膜は、直合体蓄積段階の一部のみに存在させることもできる；膜が存在する直合体蓄積段階の部分の膜および/または後に起きた、直合体蓄積段階の残りでは、攝取し単位I

ヘク膜、フル膜、マレイン膜、リップ膜、オキサル酸膜、オキサロコヘク膜、アコニクト膜およびメチルマロン膜がある。アミノ膜も、同様に不適当である。 β -酸化によつて β -ヒドロキシ脂酸になる脂肪も、同じく不適当である。酵素オキナーゼは複数素を酵素エステルに附加しないので、 α 膜は共直合体を与えない。

適当な膜は、プロピオン膜、イソ酸膜、これらおよび脂肪のヘロまたはヒドロキシ置換誘導体、例えば3-タロロプロピオン膜、3-ヒドロキシプロピオン膜、 α -ヒドロキシ脂肪膜(α -ヒドロキシ脂肪膜は不適当)、ビバリン膜、ヘロ酢酸、フェニル酢酸および安息香酸、およびこれらの不適和膜またはヘロ置換誘導体、例えばアクリル膜、メタクリル膜(2-メチルアクリル膜)、 β - β -ジメチルアクリル膜、2-3-ジメチルアクリル膜、3-タロロプロピオン膜および2-クロロプロピオン膜である。

基質は水溶性でなければならず、膜は水溶性であればそのまま、または水溶性塩例えばアルカリ

金属塩で添加する。上記の通り、場合によつては、微生物はさらに酸との反応を行うこともある。したがつて、イソブリオノン酸は $n = 1$ 、 $R^1 = R^2 = R^3 = H$ 、 $R =$ イソプロピル基の繰返し単位Ⅱを与える。 $n = 1$ 、 $R^1 = R^2 = R^3 = H$ 、 $R^4 =$ エチル基の繰返し単位Ⅱがあり、微生物が共重合体への代謝経路中で、メチル基を水素で置換することを示している。種々の酸に対する、繰返し単位Ⅱの n 、 R^1 、 R^2 、 R^3 および R^4 は次の通りである。

酸	R^1	R^2	R^3	R^4	n
プロピオン酸	エチル*	H	H	H	1
イソブリオノン酸	イソプロピル*	H	H	H	1
3-クロロプロピオノン酸	2-クロロエチル***	H	H	H	1
3-ヒドロキシプロピオノン酸	水素または2-ヒドロキシエチル	H	H	H	1
アクリル酸	水素または2-ヒドロキシエチル**	H	H	H	1
3,3-ジメチルアクリル酸	メチルまたは2-メチルプロ	メチル	H	H	1
	ピル**または2-ヒドロキシ	H	H	H	1
	2-メチルプロピル	H	H	H	1
2,3-ジメチルアクリル酸	メチルまたは1-メチル-2-ヒドロキシプロピルまたは	H	H	H	1
	1-メチルプロピル*	H	H	H	1
2-メチルアクリル酸	水素またはイソプロピル*	H	メチル	H	1
	または1-メチル-2-ヒドロキシエチル	H	H	H	1
3-クロロプロピオノン酸	Cl または2-クロロエチル	H	H	H	1
	または2-クロロ-2-ヒドロキシエチル	H	H	H	1

族	R^1	R^2	R^3	R^4	n
2-クロロプロピオニ酸	水素または1-クロロエチル または1-クロロ-2-ヒドロキシエチル	H H	Cl H	H H	1 1
クロロ酢酸	ロキシエチル	H	H	H	1
2-ヒドロキシ酢酸	クロロメチル****	H	H	H	1
ビペリン酸	エチル	H	—	—	0
	水素	H	メチル	メチル	1

註：
* エチル存在

** 2-ヒドロキシエチル存在

*** エチルおよび2-ヒドロキシエチル存在

**** メチル存在

使用できる微生物は、共重合体を製造しようと
する際またはその他の同化できる任意のポリマー
ヒドロキシ酸基含有性微生物である。バクテリア
Alcaligenes eutrophus (従来は *Hydrogeno-*
*monas eutrophus*として知られていた)種、例え
ばこの種の学術的研究に広く用いられたH16株、
(ATCC 46176-9, *J General Microbi-*
ology (1978) 1-14, p.185-192參照)およびH16株の変異株、例えば11/7B、
S801/C6, S501/C28およびS501/
C41 (それぞれ the National Collection of
Industrial Bacteria, Terry Research
Station, Aberdeen, Scotland, K. 1980
年8月18日)に寄託した、NCIB 11600、
11609、11597および11598)が特
に適している。ATCC番号は、the American
Type Culture Collection, 12301 Park
Lawn Drive, Rockville, Maryland, 20852
U.S.A.で与えられた番号である。上記の通り、
製造段階中、炭水化物を基質として用いるのが好

ましい。*Alcaligenes eutrophus* H16株
(ATCC 46176-9)は、グルコースを変化
しないが、その変異株例えば上記の11/7B、
S801/C6, S501/C28およびS501/
C41は、グルコースを変化できる。炭水化物、
特にグルコースは、コストの面をより微生物が効
率的に繁殖できるので、装置規模での好ましい基
質である。

ポリエステルは、微生物細胞内膜の膜として
製造される。ポリエステルを含有する細胞は、例
えば U.S.P. 3,107,172 に示すように、そのま
ままで成形材料として用いられるが、一般にポリエ
ステルを、バクテリア細胞から分離するのが好ま
しい。これは、細胞を細胞崩壊、次いで適当な溶
剤でポリエステルを抽出することで達成される。
適当な抽出培地の例は、ヨーロクバ酵母出芽株
1-5-12-8号に記載されている。

上記の通り、重合体が実用できるためには、グ
ルコースクロマトグラフィーで測定した重量平均分
子量 (M_w) 1,000以上でなければならない。

好ましくは、 M_w は 5 0 0 0 0 以上、より好ましくは 1 0 0 0 0 0 以上、特に 2 0 0 0 0 0 以上である。

共重合体は、常に D-立体配位を有し、 α -ヒドロキシ脂肪酸モロ重合体よりも低い融点を示す。

共重合体は、溶融成形品の製造に特に有用であり、この場合 α -ヒドロキシ脂肪酸モロ重合体の融点が好ましい。

特に興味深いのは、少量の共重合体を塩化ビニル系重合体の高分子量加工剤としての用途である。この応用では、共重合体の量は、塩化ビニル重合体に対し 0.5~1.0% である。最も効果を得るには、共重合体はランダムでなければならない。ランダム共重合体を得るには、共重合体単位数を得るために用いる酸は、少なくとも重複要件制限条件下での微生物の培養期間を通じて唯一の基質として存在するのが好ましい。

共重合体は、溶融押出し後、好ましくは重合体のガラス転移点 (T_g) と融点との間の温度で、一対またはそれ以上のロールを通過させて、フィル

ムの厚さを減少しかつ若干の分子配向を導入するフィルムの製造にも用いられる。

この発明を、以下の実験例で説明する。

実験例 1

プロピオネートの通常の代謝では、プロピオネートはサクシネートに変換し、これは TCAT サイクルのオキサロ酢酸への酸化、次いで脱カルボキシル化によりアセチル CoA となる。オキサロ酢酸の脱カルボキシル化では、両方の末端炭素は炭酸ガスとして除去される。したがつて、もしかするとサクシネートに放射性ラベルした炭素原子を有するプロピオネート。即ち ^{14}C -プロピオネートを、アセチル CoA への細胞変換に供給すれば、 $^{14}\text{CO}_2$ として放射能は失われる。重合体への何らかの ^{14}C の組込みは、プロピオニル CoA の α -ヒドロキシバレリル CoA への変換、引き続き重合からもたらされる。

Alcaligenes eutrophus 実験株 NCIB

1.159 g を、8.6 g / ml の培養ポリエチレン支持するに充分な同化性炭素および基質としての

グルコースを含む水性培地 A を用いるバッテ式振盪器で、通気培養により繁殖させた。水性培地 A は、脱イオン水 1 L 当り次の組成を有していた。

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.8 g
K_2SO_4	0.45 g
H_3PO_4 (1 M)	1.2 ml
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.5 mg
微量元素液	2.4 ml

微量元素液は、脱イオン水 1 L 当り次の組成を有していた。

$\text{CaSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.02 g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.1 g
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.1 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2.6 g

生体濃度が 4.5 g / ml に達したとき、即ち糸の同化性炭素が枯渇した後、 ^{14}C -プロピオネートを含むプロピオニン酸ソーダ 1 g / ml をグルコースとともに振盪器に加え、振盪を 5 分間継続した。次いで、細胞を汎過により回収し、重合体を

クロロホルムで抽出した。ラベルした炭素は、殆んど完全にクロロホルム溶液にあり、ラベルした末端炭素原子が炭酸ガスとして損失しなかつことを示した。したがつて、少なくとも幾らかのプロピオネートは、アセチル CoA として以外に重合体に組み込まれた。

実験例 2 (比較例)

Alcaligenes eutrophus 実験株 NCIB 1.159 g を、脱イオン水 1 L 当り次の組成を有する水性培地 B 4 0 0 0 ml を含むバッテ式振盪器で、pH 6.8、8.4°C で通気培養により繁殖させた。

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	4 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.8 g
K_2SO_4	0.45 g
H_3PO_4 (1 M)	1.2 ml
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.5 mg
微量元素液	2.4 ml

グルコースを、8 g / hr の割合で振盪器に供給

した。増殖Bの同化性蛋白の量は、2.6 g の PHB を含む細胞を支持するに充分であるつた。

4.0 時間後、細胞を遠心分離で回収した。細胞を凍結乾燥し、蛋白合物をタクロボルムで抽出した。

実施例 2

実施例 2 を抽出したが、細胞重量 3.4 g に達したとき、グルコースの代りにプロピオニン酸を 2.8 g/hr の割合で酵母器に供給した。

実施例 3

実施例 3 を抽出したが、プロピオニン酸の供給は、細胞重量 3.9 g に達したときに開始した。

実施例 4

実施例 4 を抽出したが、プロピオニン酸の供給は、細胞重量 5.6 g に達したときに始めた。

実施例 5

実施例 5 を抽出したが、細胞重量 4.8 g に達したとき、プロピオニン酸 1.2 g を一度に添加した。

実施例 6

実施例 6 を抽出したが、細胞重量 4.8 g に達したとき、プロピオニン酸 1.2 g を一度に添加した。

実施例 7

実施例 2 を抽出したが、増殖 A を用いてグルコースの代りにプロピオニン酸を 4.8 g/hr の割合で、

培養中を全体を通じて供給した。

実施例 8

実施例 2 を抽出したが、細胞重量が 8.8 g になつたとき、グルコースの代りに、グルコース 5.2 g/hr、プロピオニン酸 2.8 g/hr の割合で、グルコースおよびプロピオニン酸の混合物を酵母器に供給した。

実施例 9

実施例 8 を抽出したが、細胞重量 2.8 g に達したとき、グルコース 6.8 g/hr およびプロピオニン酸 1.2 g/hr の割合で、混合物の供給を開始した。

実施例 2 ～ 9 では、プロピオニン酸は 4.0 g/m を含む溶液として添加した。

実施例 10

実施例 2 を抽出したが、細胞重量が 2.8 g に達したとき、グルコースの代りにイングリ酸を酵母器に 2.8 g/hr の割合で供給した。イングリ酸は、160 g/m を含む溶液で添加した。

実施例 3 ～ 6 および 8 ～ 10 では、酵母器に供給した酸の重量対細胞重量が 2.8 g に達した後

(即ち系の蓄積が枯渇したとき) に酵母器に供給したグルコースの重量および酵母器に供給した酸の重量の合計の比が、第 1 表に示す値に達するまで、酵母器を維持した。

実施例 11

実施例 2 を抽出したが、細胞重量が 2.6.4 g に達したとき、グルコースの代りに 8-クロロプロピオニン酸を 4.8 g/hr の割合で 5 時間酵母器に供給した。

実施例 12

実施例 1 を抽出したが、8-クロロプロピオニン酸の供給は、細胞重量 8.4.4 g に達したときに開始した。

実施例 13

実施例 12 を抽出したが、細胞重量 8.0 g に達したとき、8-クロロプロピオニン酸 4.8 g を一度に添加し、次いでグルコースを 6.8 g/hr の割合で 7 時間供給した。

実施例 11 ～ 13 では、8-クロロプロピオニン酸は、5.0 g/m を含む溶液で添加した。

実施例 14

実施例 2 を抽出したが、細胞重量 8.1 g になつたとき、グルコースの代りにアラル酸を 4.8 g/hr の割合で 5 時間酵母器に供給した。アラル酸は、1.00 g/m を含む溶液で添加した。

第 1 表

実施例	膜	膜供給比 ^(g)	最終細胞濃度 ^(g/L)	細胞中の直合体の量 ^(wt %)
2	なし	0	20.0	7.0
3	プロピオン膜	7.5	15.6	7.0
4	プロピオン膜	5.0	18.8	6.0
5	同上	8.8	16.0	7.0
6	プロピオン膜	4	18.0	6.8
7	同上	10.0	6.4	5.5
8	プロピオン膜	1.7	18.6	5.5
9	同上	9.5	14.2	6.7
10	イソ酸膜	6.6	18.0	5.0
11	8-クロロプロピオン膜	6.1	7.4	2.5
12	8-クロロプロピオン膜	8.8	4.5	2.0
13	同上	6.5	9.8	3.5
14	アクリル膜	5.0	6.0	2.5

註。 膜供給比は、離離器に供給した膜の重量を、細胞乾燥重量 2.6 g に達した後に添加したグルコースの重量および離離器に供給した膜の重量の合計で除した値である。

実施例 2 ～ 1.4 の直合体中の共半並体確立の量は、(a)加水分解およびガスクロマトグラフィにより(b)¹³C核磁気共鳴スペクトロスコープにより決定した。

直合体の分子量は、ゲル通過クロマトグラフィで決定した。

塩素分析も、実施例 2、1.1、1.2 および 1.3 の直合体について行つた。

結果を第 2 表に示した。

8-クロロプロピオン膜からの塩素は、ほとんど直合体に見出されなかつた。したがつて、8-クロロプロピオン膜の代謝中に HCl が失われて、得られる炭素-炭素二直結合は、水素化および水和されて、予期された 2-クロロエチル基の代りに、R¹ としてエチルおよび 2-ヒドロキシエチル基が得られた。しかし、実施例 1.1 ～ 1.3 の直合体の塩素含有量は、若干の塩素が 2-クロロエチル基として存在することを示している。

第2表 ^{13}C NMR結果による重合体の構造

実施例	重合	R ₁	単位Ⅱのモル比		分子量 $M_w \times 10^{-3}$	分子量比 M_w/M_n	塩基 (ppm)
			NMR による	加水分解およびガスクロマトグラフィによる			
2	なし	—	0	0	292	2.75	4.0
3	プロピオニ酸	エチル	27	8.8	207	4.23	
4	プロピオニ酸	エチル	24	2.7	874	1.89	
5	同上	エチル	18	1.4	258	8.50	
6	プロピオニ酸	エチル	6	3	848	1.66	
7	同上	エチル	25	2.6	886	1.70	
8	プロピオニ酸	エチル	15	1.4	889	1.67	
9	同上	エチル	6	7	248	2.56	
10	イソ酪酸	エチル	80	2.9	274	2.88	
11	8-クロロプロピオニ酸	エチル 2-ヒドロキシエチル	7 1.8	— —	888	2.99	4.75
12	8-クロロプロピオニ酸	エチル 2-ヒドロキシエチル	4 1.2	— —	876	1.77	2.65
13	8-クロロプロピオニ酸	エチル 2-ヒドロキシエチル	2 0.6	— —	811	1.99	4.5
14	アクリル酸	2-ヒドロキシエチル	6.5	—	858	2.86	

高分解能 ^{13}C NMR を用いて、実施例 8 ～ 10 の共重合体の単位体序列を調べた。カルボニル基の炭素原子から得られるシグナルは、その環後に応じて、異なる化学シフトで起きることが判明した。したがつて、単位 I および II ($n=1$ 、 $R^1=C_2\text{H}_5$ 、 $R^2=R^3=H$) を含む重合体では、可能な序列は次の通りである。

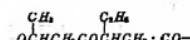
A. プテレート-ブテレート



B. ベンタノエート-ベンタノエート



C. ブテレート-ベンタノエート



実施例 2 ～ 10 の重合体の ^{13}C NMR 検査は、それぞれ 1.69.07、1.69.25 および 1.69.44 ppm で起きる 3 個の共鳴を示した。M. Iida 外 (Macromolecules 11 (1978) 490) によれ

ば、1.69.07 ppm での共鳴は、ブテレート-ブテレートの序列 A であり、1.69.44 ppm はベンタノエート-ベンタノエートの序列 B である。検討によれば、1.69.25 ppm でのシグナルは、ブテレート-ベンタノエートの序列 C から生じる。

実施例 10 の重合体の ^{13}C NMR の結果の定量的分析は、次の結果を与えた。

序列 A (ブテレート-ブテレート) 55%

序列 B (ベンタノエート-ベンタノエート) 14%

序列 C (ブテレート-ベンタノエート) 31%

これらの結果は、実施例 10 の重合体が単位 I および II ($n=1$ 、 $R^1=C_2\text{H}_5$ 、 $R^2=R^3=H$) の共重合体を実質的量で含むことを、明らかに示している。しかし、検査し単位 I のホモ重合体の若干も存在する可能性がある。

実施例 2 ～ 10 の重合体は、全部 D (-) 立体化を有していた。

抽出したままの共重合体の熱的挙動は、コンピューターデーターパンチ分析付のジュポン 1090 システムを用いて、先ず差動熱計法 (DSC) で決

定した。DSCを、190°Cで圧縮成形し、完全に結晶化した製品を得るために、プレス中に冷却した後の試料でも実施した。それぞれの場合、見本は空気中で20°C/分で加熱し、スタート(T_s)および最高浴液のピータ(T_p)の温度をその面積とともに記録した。アニーリングした試料の加熱を200°Cまで継続し、完全に溶融させるため1分間等温にした後、試料を液体窒素中で急冷した。非晶領域のガラス転移温度(T_g)を決定するために、DSCを再び行つた。最後に、密度勾配浮遊法により、アニーリングした共重合体の密度を測定した。

結果を、第8表に示した。

第 8 表

実施例	抽出重合体のDSC			アニーリングした重合体のDSC				密度 (g/cm ³)
	T_s °C	T_p °C	面積 (J/g)	T_g °C	T_s °C	T_p °C	面積 (J/g)	
2	140	188	100	5.9	140	191	127	1.256
3	120	125 165	5 20	-1.9	140	171	18	1.172
4	120	170	50	0.8	140	182	44	1.174
5	110	120 170	5 50	2.2	140	177	45	1.200
6	120	172	100	2.7	120	173	96	1.225
7	80	142	84	0.4	80	182	40	1.198
8	110	120 165	5 60	2.0	140	174	43	1.198
9	110	156	89	4.0	110	168	81	1.210
10	60	65 120 165	10 8 25	-2.0	120	172	26	1.188
11	110	170	57	5.0	120	180	73	-
12	110	177	86	4.1	120	178	86	1.182
13	100	172	98	5.9	120	171	96	1.218
14	110	172	84	2.7	110	174	75	1.212